Zur Bedeutung der 17-Ketosteroide sowie der Calciumwerte im Harn immobilisierter Hühner

Gerhard Heller

1971

Aus dem Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels
der Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. I. Gylstorff

ZUR BEDEUTUNG DER 17-KETOSTEROIDE SOWIE DER CALCIUMWERTE IM HARN IMMOBILISIERTER HÜHNER

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Maximilians-Universität München

von

Gerhard Heller

aus Planegg

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Prof. Dr. I. Gylstorff
Korreferent:	Prof. Dr. H. Kraft

Tag der Promotion: 2. Juli 1971

U N I - D r u c k , München 13, Amalienstr. 85

Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
LITERATUR	1
MATERIAL	13
METHODIK	13
1. Anlegen des Anus praeternaturalis	13
2. Blutuntersuchung	18
3. Knochenuntersuchung	18
4. Harnuntersuchung	20
VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	22
ERGEBNISSE	23
DISKUSSION	35
ZUSAMMENFASSUNG	41
SUMMARY	42
LITERATURVERZEICHNIS	43

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

		Seite
Abbildungen 1-4:	Operationsverlauf	14/15
Abbildung 5:	Graphische Darstellung der 17-Ketosteroidausscheidung, des Harncalciums und des Blutmagnesiums der Tiere im kleinen Käfig.	33
Abbildung 6:	pH-Werte des Harns und Harncalcium-darstellung der Gruppen 1 und 2	33
Abbildung 7:	Graphische Darstellung der Gesamt-eiweiß- und Calciumblutwerte der Grauppen 1 und 2	34
Abbildung 8:	Blutmagnesium- und Blutphosphor-werte beider Versuchsgruppen, graphisch dargestellt.	34

EINLEITUNG UND LITERATUR

Seit dem Jahre 1955 wird in Amerika bei Hühnern in individuellen Käfigen ein Syndrom beobachtet, das mit Rückgang der Legetätigkeit und mit Bewegungsstörungen einhergeht und als Käfigmüdigkeit bezeichnet wird. (GRUMBLES 1955). Bei diesem Syndrom werden von einer Reihe von Autoren Nebennierenrindenfunktionsänderungen als auslösende Ursache angenommen, ohne daß hierzu schlüssige Beweise vorliegen.

Die vorliegende Arbeit soll die 17-Ketosteroidausscheidung im Harn im Verlauf einer Immobilisation verfolgen, wobei gleichzeitig im Blut der Versuchstiere Gesamteiweiß, Magnesium, anorganischer Phosphor und Calcium bestimmt werden und im Harn der Tiere die pH-Werte, Calcium, anorganischer Phosphor und die 17-Ketosteroide.

COUCH (1955) befaßt sich zunächst nur mit dem Problem der Legestörung, ohne auf die Ursachen der Bewegungsunfähigkeit einzugehen. BELL, SILLER und CAMPBELL (1959) versuchen als erste, die Ursache dieser Krankheit experimentell zu klären. Die Autoren untersuchen Blut und Knochen von erkrankten Hennen auf ihren Gehalt an Calcium und Phosphor und kommen dabei zu folgenden Ergebnissen: Im Blutcalcium- und Blutphosphorspiegel werden keine abnormalen Veränderungen gefunden. Die Knochenanalysen hingegen ergeben ein hochgradiges Calciumdefizit, das vor allem in der Tibia auftritt. Aufgrund dieser Analysenergebnisse glauben die Autoren, daß die Käfigmüdigkeit auf einer Imbalance des Hormonstoffwechsels beruht, wofür sie sowohl eine Überproduktion an Östrogenen, als auch an Corticosteroiden und an Nebenschilddrüsenhormonen verantwortlich machen. Erst im Jahre 1968 führt KING die experimentelle Untersuchung über die Ursache der Käfigmüdigkeit weiter. Er stellt fest, daß die bei den Hennen auftretenden Beinschwächen reversibel sind. Wenn die in Mitleidenschaft gezogenen Tiere aus dem Käfig genommen und auf den Boden gesetzt werden, gesunden sie nach wenigen Tagen. Bei Verwendung von 5 verschiedenen Käfiggrößen kann er nur bei den Tieren im kleinsten Käfig (15,2 x 24,4 cm) regelmäßig eine Beinschwäche erzeugen, die nach Überstellung in einen großen Käfig mit Einstreu wieder verschwindet. Aufgrund dieser Erscheinungen, jedoch ohne weitere Untersuchungen der Knochen,

vermutet der Autor, daß die Käfigmüdigkeit eine Form der Osteoporose sei, bei der die Knochenmasse als Folge einer Erniedrigung der Knochenmatrixbildungsrate vermindert wird. Als Ursache dieser Osteoporose sieht er die große Bewegungseinschränkung der Hennen in den engen Käfigen an.

Auch für BARTTER (1957) ist die Käfigmüdigkeit eine Form der Inaktivitätsosteoporose, als Folge einer verminderten physischen Beanspruchung der Tiere. Als ihre Ursache sieht er primär eine Störung im Eiweißstoffwechsel an. Durch Stickstoffbestimmung in der Knochenmatrix gelingt es ihm, dort einen Stickstoffmangel nachzuweisen, den er auf die Wirksamkeit "Stickstoff - zurückhaltender Substanzen" zurückführt. Zu diesen Substanzen sind unter anderem auch die Nebennierenrindensteroide zu zählen. Auch dieser Autor beobachtet, was später von EWING (1963) und von PILASKI (1970) nochmals bestätigt wird, daß bei der Käfigmüdigkeit weder der Calcium- noch der Phosphorblutspiegel verändert sind.

Nach EWING (1963) wird im Verlaufe dieses abnormen Zustandes die Eischalenqualität nicht beeinträchtigt. Die untersuchten Knochen (Femur, Tibia) sind dagegen leicht brechbar und zeigen erniedrigte Knochenaschewerte.

Die Inaktivitätsosteoporose gilt schon lange als eine besondere Form der Osteoporose. Sie wird zum ersten Male von BRANDES (1913) als "akute Knochenatrophie" beschrieben. Er erzeugt durch Tenotomie beim Kaninchen einen akuten Knochenschwund des Calcaneus, führt diesen aber auf die Durchtrennung der vegetativen Nerven zurück, da die gleiche Atrophie auch auftritt, wenn nur die Sehnenhaut des Tendo calcaneus durchtrennt wird.

1936 erzeugt RIEDER beim Kaninchen ebenfalls eine Atrophie des Calcaneus und zwar ausschließlich durch Ruhigstellung, durch Eingipsen einer Extremität, was ihn zu weiteren Untersuchungen anregt. Bei einem dreißigjährigen Mann, dessen Bein eingegipst ist, kann röntgenologisch eine akute Knochenatrophie nachgewiesen werden. RIEDER vertritt aber die Auffassung, daß die Inaktivität als auslösende Ursache eines Knochenschwundes nur soweit in Frage kommt, als infolge der Ruhigstellung jeder funktionelle, nutritive und formative Reiz fehlt.

Später beobachten DEITRICH, WHEDON und SHORR (1948) bei immobilisierten Menschen eine Hypercalciurie. Bei Hennen untersuchen als erste WHITTOW, STURKIE und STEIN (1965) eine dreistündige Immobilisation, wobei sie jedoch nur den Hämatokritwert, den Blutdruck und die Pulsfrequenz messen. Nach einer Stunde Fixation fällt der erhöhte Blutdruck zunächst wieder ab, während die Pulsfrequenz kontinuierlich ansteigt. Diesen Kurzversuch baut PILASKI (1970) weiter aus. Er bestimmt unter anderem Calcium- und Phosphorwerte in Blut und Knochen, Magnesium und Gesamteiweiß im Blut. Dabei kommt er zu folgenden Ergebnissen:

Die Knochencalciumwerte ergeben bei den immobilisierten Tieren bis zum 44. Versuchtstag einen deutlichen Abfall, steigen dann aber wieder an. Die Phosphorwerte lassen keine signifikanten Veränderungen erkennen.

Die Blutcalciumwerte zeigen keine signifikanten Veränderungen, während der organische Blutphosphor bis zum 44. Tage hochsignifikant abfällt, von da ab jedoch wieder kontinuierlich ansteigt.

Die Gesamteiweißwerte im Blut steigen bis zum Versuchsende stetig an, ebenso die Magnesiumwerte.

URIST (1960 a) untersucht weiße, in Käfigen untergebrachte Leghornhennen zu Beginn der Legeperiode. Bei 50 - 75 % dieser Tiere treten zu diesem Zeitpunkt schwere Osteoporoseerscheinungen auf. Diese sind charakterisiert durch eine verdünnte Knochencortex, vergrößerte Haver'sche Kanäle, erniedrigte Osteoblastenaktivitäten und durch das weitgehende Fehlen von Osteoklasten.

Durch ACTH- oder Cortisongaben kann URIST die im Gewebeschnitt festgestellten Veränderungen verstärken. Da er die gleiche Form der Osteoporose nicht nur bei Hennen im engen Käfig beobachten kann, sondern auch bei Bodenhaltung, folgert er, daß die Ursachen dieser Veränderungen nicht allein eine durch Käfighaltung ausgelöste Störung des Endocriniums sein kann. Er vermutet einen Inzuchtfaktor.

Auch SNOYENBOS et al. (1957) sind der Meinung, daß die Käfigmüdigkeit eine besondere Form der Osteoporose mit starker Demineralisierung der Tibien ist.

Im Gegensatz dazu betonen RIDELL (1967), RUDELL et al (1968) sowie SCHIEFER und DORN (1969), daß bei allen Tieren, die gelähmt sind, Frakturen im Bereich des 4. und 5. Brustwirbels bestehen. Die Lähmung ist als Folge des Druckes der frakturierten Teile auf das Rückenmark anzusehen. Eine Beteiligung von osteoporotischen Vorgängen wird von SCHIEFER und DORN völlig abgelehnt, während RIDELL et al. außer den Frakturen des 4. und 5. Brustwirbels histologisch auch osteoporotische Veränderungen nachweisen können, wobei die Knochencortex erheblich verdünnt ist. Bei den untersuchten Femora und Tibien ist mehr osteoides als calcifiziertes Gewerbe vorhanden.

URIST und DEUTSCH (1960 b) untersuchen die Wirkung von Cortison auf die Knochenbildung von Hähnen, Kapaunen und Hennen. Bei allen Tieren tritt spätestens vier Wochen nach Verabreichung von hohen Dosen Cortison (50 - 300 mg/kg) eine deutliche Osteoporose auf. Histologisch finden sich eine verdünnte Knochencortex und eine Vergrößerung der Haver'schen Kanäle. Die Knochen sind leichter als die der Kontrolltiere und extrem brüchig. Die Blutuntersuchungen ergeben keine veränderten Calciumwerte bei den behandelten gegenüber den unbehandelten Tieren.

JONES (1957) schreibt in seinem Buch "THE ADRENAL CORTEX", daß eine anhaltende übermäßige Sekretion von adrenocorticalen Hormonen, besonders aber von Gluccorticoiden, die sogenannte Osteoblastenosteoporose auslöst. Durch die vermehrte Einwirkung dieser Nebennierenrindenhormone wird die Osteoblastenaktivität so stark herabgesetzt, daß daraus ein Mangel an zu mineralisierender Grundsubstanz resultiert. Dieser Prozeß kann durch Hemmung der Hypophysensekretion oder durch Beeinflussung der Nebennierenrinde rückgängig gemacht werden. Auch MOLINATTI, CAMANNI und OLIVETTI (1961) beobachten eine Osteoporose beim Menschen nach vermehrter Glucocorticoidausscheidung der Nebennierenrinde. Die von den Verfassern an 16 an Cushing Syndrom erkrankten Patienten beobachteten osteoporotischen Vorgänge (Verdünnung der Knochencortex, Hypercalciurie, herabgesetzte Calciumwerte der Knochenasche) werden von ihnen als Folge der katabolischen Wirkung der glukoaktiven Hormone auf die Proteine angesehen. Diese veranlassen eine unzulängliche Bildung der Knochenmatrix und somit fehlt das Substrat für die Mineralisierung, ganz oder teilweise. Auch bei diesen Patienten ist die tägliche Ausscheidung von Calcium im Harn hoch, während sich die Serumcalciumwerte in normalen Größenordnungen bewegen.

Diese Untersuchungsergebnisse werden durch Mitteilungen von KENNY (1960) ergänzt: Er sieht nach Parathyreoidektomie bei Ratten eine ausgeprägte Hypocalciurie und Hypocalcämie. Hingegen erniedrigt sich nach Adrenalektomie nur der Harncalciumspiegel. Die Serumcalciumwerte zeigen normale Schwankungsbreiten.

Nach diesen Ergebnissen ist die Parathyreoidea an den von MOLINATTI, CAMANNI und OLIVETTI (1960) beschriebenen Veränderungen nicht beteiligt.

EISENSTADT und COHEN (1955) stellen drei Fälle von Osteoporose beim Menschen nach Behandlung mit Cortison und Corticotropin vor, wobei die Osteoporose ebenfalls primär als Störung des Proteinstoffwechsels und nicht als Störung des Calcium-Phosphorstoffwechsels angesehen wird.

Um den Einfluß der Nebennierenrindenhormone auf den Knochencalciumgehalt zu studieren, applizieren AHO und HERRALA (1969) neun erwachsenen und acht jungen Ratten Cortison s.c., 26 Tage lang jeden zweiten Tag 10 mg. Bei den so behandelten erwachsenen Tieren erscheinen die Femora brüchiger als bei den Kontrolltieren. Dagegen zeigt das Trockengewicht der Knochen keine Unterschiede. Der Calciumgehalt der Knochen liegt bei der mit Cortison behandelten Gruppe niedriger als bei der Kontrollgruppe.

Bei den jungen Ratten sind die gleichen Veränderungen wesentlich intensiver ausgeprägt.

AHO und HERRALA bestätigen die Meinung, daß die durch Corticosteroide ausgelöste Osteoporose auf einer herabgesetzten Osteoblastenfunktion und damit auf einer mangelhaften Bildung von Knochengrundsubstanz beruht.

Dagegen vertreten CLARK, GEOFFREY und BOWERS (1959) die Auffassung, daß die durch Überproduktion von Corticosteroiden ausgelöste Osteoporose auf einer direkten Beeinflussung des Knochencalciums durch die Nebennierenrindenhormone beruht.

Als Beweis dienen ihnen Fütterungsversuche von Ratten mit Ca^{45}. 53 Tage nach Aufnahme des markierten Calciums werden die Ratten mit Cortico-

steroiden behandelt und zwar mit 2 mg Hydrocortison / 100 g Körpergewicht. Nach dreitägigem Abfall der Calciumausscheidung im Harn unmittelbar nach der letzten Injektion, steigt die Ausscheidungsrate des Calciums auf das fünffache der Normalwerte an. Nach 12 Tagen können die Autoren das markierte Calcium nicht mehr im Knochengewebe der hormonbehandelten Tiere feststellen.

CLARK und GEOFFREY (1958) beobachten erhöhte Calciumharnausscheidung nach Applikation von Magnesiumsalzen, Nebenschilddrüsenextrakt, Nebennierenrindenextrakt und nach übermäßiger Gabe von Vit. D_3. Obwohl alle verwendeten Substanzen Hypercalciurie hervorrufen sollen, ist doch eine unterschiedliche Größenordnung der Calciumharnausscheidung festzustellen. Am höchsten liegt die Ausscheidung von Calcium im Harn bei den beiden Gruppen, die mit $MgSO_4$ oder mit Hydrocortison behandelt sind. Eine hochsignifikante Erhöhung der Calciumausscheidung im Harn tritt jeweils erst vier Tage nach der Behandlung auf. Weitere Untersuchungen von CLARK und GEOFFREY und BOWERS (1959) erbringen ähnliche Ergebnisse. Dagegen tritt bei den mit Parathyreoidextrakt behandelten Tieren eine Erhöhung der Calciumharnausscheidung sehr kurzfristig ein, nämlich innerhalb von 12 Stunden. Anschließend pendelt sich der Calciumspiegel schnell wieder auf seine normale Höhe ein. Der Calciumgehalt des Blutes ist nur bei den Tieren erhöht, die mit Nebenschilddrüsenextrakt behandelt worden sind. $MgSO_4$ soll eine unmittelbare und direkte Wirkung auf das Calcium des Knochens haben, ohne daß gleichzeitig mehr Magnesiumionen in den Knochen eingebaut werden. Magnesium scheint als osteolytische Substanz zu wirken. CARLSTRÖM (1955) weist dem Magnesium im Mineralstoffwechsel ebenfalls eine sehr bedeutende Rolle zu, jedoch nicht wie CLARK und GEOFFREY (1958) eine osteolytische, sondern eine regulierende Funktion in der Mineralisierungsphase. Magnesium hat die Aufgabe, die Mineralisierung des Skelettes in physiologischen Grenzen zu halten. Nach der Vorstellung CARLSTRÖMS halten die Magnesiumionen die Oberfläche der kristallinen Mineralien besetzt und hemmen damit eine weitere Mineralanlagerung. Auch andere Autoren (BACHRA, TRAUTZ und SIMON, 1965 und SCHMIDT, 1968) vertreten dieselbe These. DRAPER (1964) vermutet einen Zusammenhang zwischen der senilen Osteoporose bei Mäusen und einem erhöhten Magnesiumblutspiegel. Der Autor meint, daß Magnesium die ultrafiltrierbare Calciumrate im Serum senkt, wodurch ein Calciumdefizit entsteht,

das zur Osteoporose führt. Dieselbe Wirkung, die DRAPER (1964) dem Magnesium zuschreibt, zeigt LAAKE (1960) für die Corticosteroide auf. Nach Langzeitbehandlung mit Corticosteroiden treten bei 16 Patienten röntgenologisch erkennbare Osteoporosen und Spontanfrakturen auf. Blutuntersuchungen ergeben keine abweichende Werte. Besonders schnell tritt die Osteoporose bei den Patienten auf, die keine physische Arbeit verrichten. Harnanalysen zeigen einen sehr starken Anstieg des Harncalciums, was nach LAAKE einer reduzierten Rückresorption in den Nierentubuli zuzuschreiben ist. Da die filtrierbare Rate des Serumcalciums nicht verändert ist, muß eine direkte Beeinflussung der Nierentubuli vorliegen.

Auch die neuere Literatur (SIEGEL 1968) bezeichnet eine vermehrte Ausscheidung von Glucocorticoiden als auslösenden Faktor für eine Osteoporose, bei der sich zwar der Blutcalciumspiegel nicht ändert, jedoch die ultrafiltrierbare Calciumrate im Serum wesentlich erhöht ist, sodaß die Calciumausscheidung mit dem Harn sehr hoch ist. Aus dem Knochen wird immer wieder neues Calcium mobilisiert, um den Blutcalciumspiegel auf einer konstanten Höhe zu halten. Unter normalen Bedingungen wäre bei solch einer Mobilisierung die Nebenschilddrüse beteiligt. Da histologisch aber weder großzellige Ostecklasie noch überhaupt vermehrt Osteoklastenansammlungen nachgewiesen werden können (EGER, 1965), wird eine Beteiligung der Parathyreoidea verneint. SIEGEL (1968) erklärt die Wirkungsweise der glucoaktiven Hormone nicht nur mit einer Beeinflussung der osteoiden Substanzen, sondern auch mit einer antagonistischen Wirkung dieser Hormone auf das Vit. D, wodurch die Calciumresorption aus dem Darm gehemmt wird.

Diese sehr unterschiedlichen Auffassungen über die pathogenetischen Faktoren bei der Osteoporose dürften teilweise durch Lücken im physiologischen Grundwissen und durch Unterschiede zwischen den einzelnen Tierarten bedingt sein.

Während die Nebennierenrindenhormone beim Säuger einer überwiegenden Regulation durch die Hypophyse unterliegen, ist dies bei den Vögeln nicht in dem gleichen Umfange nachgewiesen. Über die Abhängigkeit der Nebennierenrinde beim Geflügel arbeiten MA und NALBANDOV (1963).

Mit einer hypophysektomierten Gruppe und einer Kontrollgruppe weisen sie nach, daß nach der Hypophysektomie die Nebenniere des Huhnes genauso wie die der Säuger zunächst atrophiert, nach 15 Tagen aber wieder ihr Normalgewicht erreicht und sogar das Nebennierengewicht der Kontrollgruppe teilweise übertrifft. Die Verfasser schließen daraus, daß die Nebenniere der Hühner nicht in dem Maße von der Hypophyse abhängig ist, wie die der Säuger. Dieselben Verfasser (1964) finden erwartungsgemäß nach Hypophysektomie eine im Vergleich zum Säuger weniger stark herabgesetzte Corticoidproduktion der Nebennierenrinde. Dieselben Beobachtungen machen auch NEWCOMER (1959) sowie RESKO und NORTON (1964).

Weitere Versuche von MA und NALBANDOV (1963) außerdem von RESKO et al. (1964) beweisen, daß der Hypothalamus, die Eminentia mediana und der Hypophysenstiel eine stark regulatorische Funktion auf die Nebenniere des Huhnes ausüben.

Eine Voraussetzung für die Fortschritte auf dem Gebiete der Endokrinologie war die Entwicklung von geeigneten Nachweismethoden zur Identifizierung einzelner Steroidhormone.

ZAFFARONI, BURTON und KEUTMANN (1950) sind die ersten, die die Möglichkeit der papierchromatographischen Trennung der Nebennierenrindenhormone ausnutzen. Sie verwenden WHATMAN Papier Nr. 1 und als Lösungsmittel Benzol, das mit Formamid oder Toluol gesättigt ist. Entwickelt werden diese Chromatogramme entweder in alkalischem Silbernitrat oder mit Jod^7 - oder Kaliumpermanganatlösung.

Da die Wanderungsgeschwindigkeit der damals bekannten sechs Corticosteroide sehr weit auseinanderliegt, ist es nicht möglich, alle Hormone mit einem Chromatogramm zu erfassen.

Harncorticoide weisen erstmals DETTER, KOLLMEIER und KLINGMÜLLER (1967) mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nach. Nach heißer

Säurehydrolyse wird der Harn mit Äther extrahiert und mit Methylenchlorid/ Äthylacetat auf Kieselgel siebenmal rechromatographiert. Dabei können bis zu acht Fraktionen identifiziert werden.

In Recoveryversuchen ist der Verlust an 17-Ketosteroiden sehr gering, so daß die Methode der Dünnschichtchromatographie derzeit wohl als eine der genauesten betrachtet werden kann.

Drei einfache Methoden zum Nachweis von Steroiden finden PHILIPPS und JONES (1958) beruhend auf:

1. Reflexphotographie im UV-Licht (= 253,7 mm)
   Bei dieser Methode werden die Steroide mit Hilfe spezifischer fluoreszierender Stoffe markiert.
2. Reaktion mit Tetrazoliumchlorid oder Tetrazoliumblau, wobei es zu direkten Farbreaktionen mit den Steroiden kommt.
3. Fluoreszenzreaktion mit Na OH

Diese drei Methoden sind jedoch für eine genaue quantitative Bestimmung nicht so gut geeignet, da sie zu viele Fehlerquellen beinhalten.

Die Methode nach GRAEF und STAUDINGER (1967) weist nach Recovery-versuchen den minimalsten Verlust an 17-Ketosteroiden auf.

Bestimmt werden 11-ß-Hydroxyandrosteron, 11-Ketoandrosteron, 11-ß-Hydroxyätiocholanolon und 11-Ketoätiocholanolon.

Als Grundlage werden 20 ml zentrifugierter Harn verwendet, der mit Eisessig auf pH 5,2 eingestellt, nach Zugabe von 50 mcl Glucoronidase/ Arylsulfatase, einem Extrakt aus der Schnecke Helix pomotia, und nach Zugabe von 1 ml Acetatpuffer pH 5,2 24 h lang bei 37° C inkubiert wird. Danach wird der Harn mit 50 %tiger Schwefelsäure auf pH 1 angesäuert. Nach Lösen von 4 g Na Cl wird dreimal mit je 50 ml Äthylacetat, das zuvor mit 1/10 Volumen 8 %tiger Natriumhydrogencarbonatlösung und dreimal mit Wasser ausgeschüttelt, über Calciumchlorid getrocknet und abdestilliert wird, extrahiert. Alle drei Extrakte werden zusammengeschüttet und wiederum bei 37° C inkubiert. Nach Abkühlen auf Zimmer-

temperatur werden die Extrakte zweimal mit je 20 ml 1 N Na OH und zweimal mit je 20 ml Wasser ausgeschüttelt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit 10 ml Methanol, das vorher über eine Füllkörperkolonne destilliert wird, aufgenommen.

Zur Dünnschichtchromatographie und Bestimmung der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide dampft man 3 ml der Lösung am Rotationsverdampfer im Vakuum ein.

Als Dünnschichtplatten werden Fertigplatten der Firma Merck (Größe 20 x 20 cm) benutzt, die mit Aluminiumoxid 250 mcm dick beschichtet sind. Sie werden im Trockenschrank 4 h lang bei 125° C stark aktiviert und anschließend im Exsikkator über Blaugel aufbewahrt. Zur Bestimmung der vier Hormone wird der Verdampfungsrückstand von 3 ml Harn aus dem Zentrifugenröhrchen mit 2 x 100 mcl Aceton 1,2 cm vom unteren Rand punktförmig aufgetragen. Am linken und rechten Rand der Platte werden auf die gleiche Art und Weise 25 mcl eines Gemischs der vier Steroidhormone mit je 5 mcg Steroid aufgetragen, die Platten in die Chromatographieentwicklungskammer gesetzt und 3 h lang in einem Gemisch aus Äthylacetat/Cyclohexan (65 : 35) entwickelt.

Nach dem Entwickeln werden die Platten mit einem warmen Föhn getrocknet, der Mittelteil, in dem die Harnextrakte gelaufen sind, abgedeckt und die Ränder mit Zimmermannreagenz besprüht, das aus einer 2 : 1 Mischung aus 2 %tigem äthanolischen m-Dinitrobenzol und aus methanolischer Kalilauge besteht. (7,5 g K OH in 50 ml Methanol).

Nach zweimaligem Ansprühen werden die Referenzsubstanzen am linken und rechten Plattenrand sichtbar. Von hier aus können nun die Lagen der einzelnen Hormonflecke im Mittelteil der Platte markiert und ein Rechteck von 3 x 1,5 cm ausgekratzt werden, nachdem links und rechts der Startflecken des Harnextraktes im Abstand von 1,5 cm Striche gezogen worden sind.

Nach Auskratzen der Rechtecke überführt man das Aluminiumoxid in Zentrifugenröhrchen, fügt jedem Röhrchen eine Glasperle und 2 ml Methanol zu, schüttelt auf der Schüttelmaschine 5 min lang und zentri-

fugiert anschließend bei 3000 U/min ebenfalls 5 min lang. Der klare Überstand wird in Zentrifugenröhrchen mit Schliff überführt. Das Aluminiumoxid wird noch einmal auf dieselbe Weise eluiert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum abdestilliert.

Zu dem Verdampfungsrückstand wird 0,4 ml einer 1 %-tigen äthanolischen m-Dinitrobenzollösung pipettiert, umgeschüttelt und 0,3 ml 8 N K OH zugefügt. Nach Durchmischen werden die Röhrchen 25 min. lang in ein Wasserbad von 25° C gestellt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur versetzt man mit 2 ml 75 %-tigem Alkohol.

Ebenso wird mit einem gleichgroßen Areal der Platte verfahren, auf dem kein Harnextrakt gelaufen, das aber auch nicht angesprüht ist, um den Plattenleerwert zu bekommen. Alle Hauptwerte und der Plattenleerwert werden im Photometer "Eppendorf" gegen den Reagenzienleerwert mit dem Filter 546 nm gemessen, wobei die günstigste Schichtdicke der Küvetten 10 mm beträgt.

Zur Bestimmung der Standardwerte pipettiert man 50 mcl Standardlösung jedes der vier Steroide mit je 5 mcg Steroiden in Zentrifugenröhrchen mit Schliff, läßt an der Innenwandung des Röhrchens 1 ml Methanol herablaufen und verdampft das Lösungsmittel im Vakuum.

Mit diesen Standardproben wird der gleiche Farbreaktionstest durchgeführt wie mit den Hauptproben. Die erhaltenen Werte werden zu Berechnung verwendet, nachdem der Plattenleerwert von den Hauptwerten abgezogen ist.

Eine Voraussetzung für die Bestimmung der 17-Ketosteroide im Harn des Huhnes ist eine getrennte Gewinnung von Faeces und Harn, da diese Exkrete beim Huhn gemeinsam aus der Kloake entleert werden. In der Literatur sind hierfür verschiedene Techniken beschrieben worden. Einer der ersten Versuche erfolgte durch Kathederisierung der Ureteren (COULSON und HUGHES 1930) oder durch chirurgische Freilegung der Ureteren und deren Herauslagerung aus der Bauchhöhle. (HESTER et al., 1940; HART und ESSEX, 1942; DIXON und WILKINSON, 1947). Alle diese Methoden sind aber nur für eine kurzfristige Harnsammlung verwendbar und an Zeit und Material zu aufwendig. In neuerer Zeit wird das Anlegen eines Anus praeter naturalis vorgezogen. Als erster beschreibt 1947 ROTHCHILD diese Technik. Er lokalisiert den artifiziellen Anus an der seitlichen Bauchwand, da hier die geringste Gefahr einer Überwucherung mit Haut besteht.

IVY, BRAGG und STEPHENSON (1968) setzt zunächst einen Gummischlauch in das Rectum, dann ein Glasrohr, das er mit einer Manschette fest an die äußere Haut näht. Zur Kollektion des Harnes benutzen alle o.a. Verfasser eine zur Mitte hin geneigte Unterlage, von wo aus sie den Harn mit einem Beutel auffangen.

Zur Anästhesie wird bei allen Operationen ein Barbiturat verwendet.

MATERIAL UND METHODIK

A: Material:

Für die Versuche werden 12 Wochen alte Junghennen der Hybridlinie "Shaver Star Cross" verwendet.

B: Methodik:

1. Anlegen des Anus praeter naturalis

Die in er Literatur beschriebenen Operationstechniken (ROTHCHILD 1947; IVY, BRAGG und STEPHENSON 1968) werden wie folgt modifiziert, um die Harnkollektion zu vereinfachen.

a) Anästhesie

Für die Sedierung und Teilanästhesie wird "Parkesernyl" verwendet, ein Phenylcyclidin-hydrochlorid der Firma "Parke Davis", das den Tieren unverdünnt in einer Dosis von 0,2 - 0,3 ml i.m. appliziert wird. Nach ca. 5 min. zeigen die Tiere ataktische Bewegungen und Gleichgewichtsstörungen. Nach weiteren 3 min tritt eine gute Analgesie ein. Abwehrbewegungen der Tiere werden nur in geringem Maße beim Durchtrennen der Haut festgestellt, die jedoch den Operationsverlauf nicht stören.

b) Operationstechnik

Genau wie bei IVY, BRAGG und STEPHENSON (1968) werden die Haut, die Muskulatur und das Peritonäum paramedian durch einen etwa 7 cm langen Schnitt durchtrennt. Nun wird mit dem Zeigefinger nach sorgfältiger Vergewisserung des Darmabschnittes der Enddarm erfaßt, stumpf vom Gekröse getrennt und ca. 5 cm aus der Bauchhöhle herausgelagert. Nach Abklemmen des Kloakennahen Teiles des Darmes (Abb. 1) und nach einer Ligatur vor der Kloake, wird der Enddarm mit der Schere durchtrennt, gesäubert, desinfiziert und zurück in die Leibeshöhle versenkt. (Abb. 2)

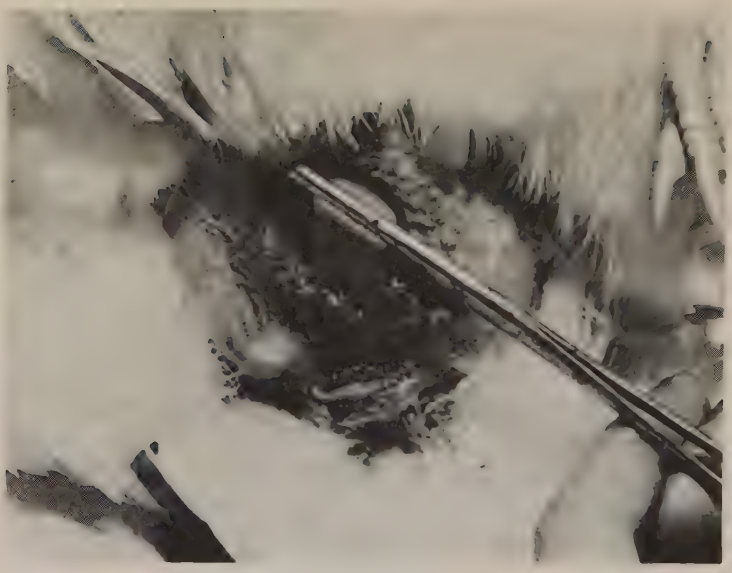

Abbildung 1

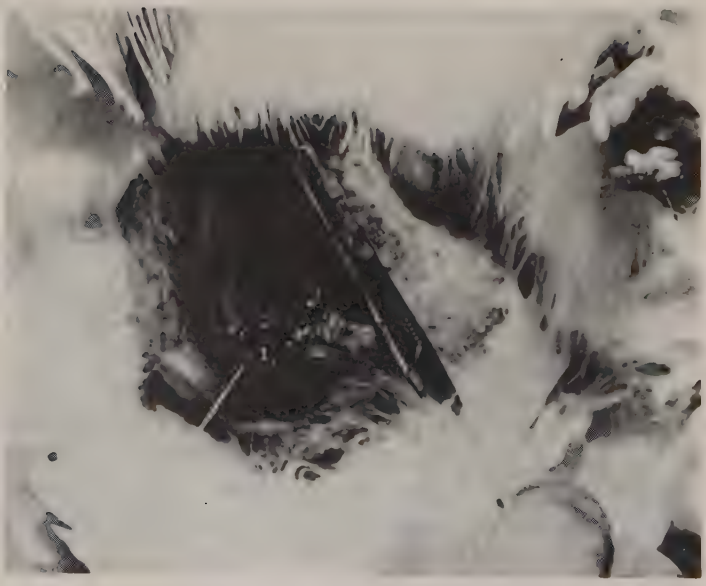

Abbildung 2

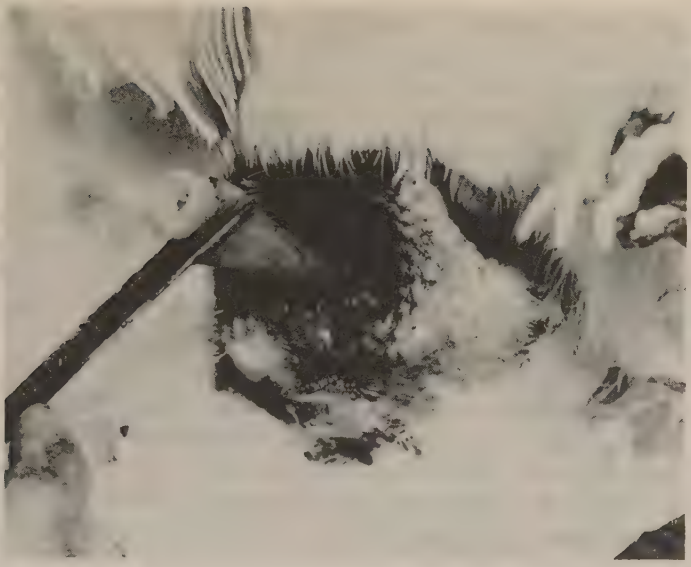

Abbildung 3

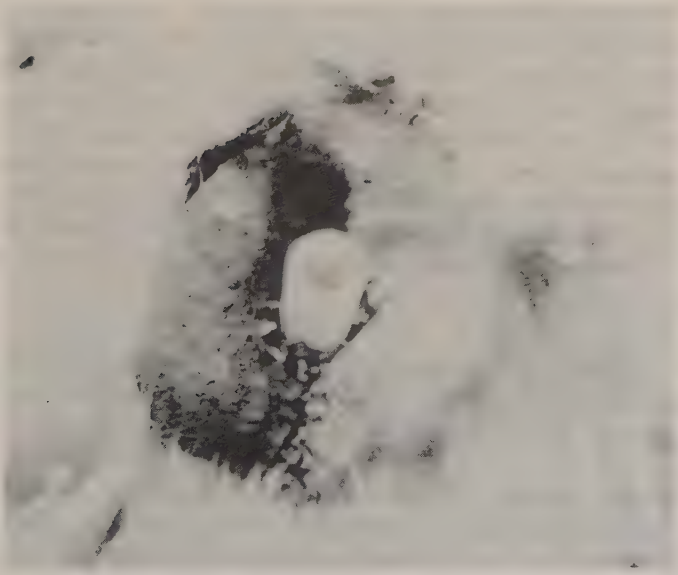

Abbildung 4

Das durch Abschneiden der scharfen Kanten vorbereitete Silikonröhrchen wird nach Lösen der Darmklemmen in den mit einer stumpfen Klemme gedehntem Darm bis kurz vor die Einmündung der Blinddärme geschoben. Darm und Röhrchen werden mit einer Klemme verbunden (Abb. 3) und anschließend mit 6 8 feinen Heften aneinander fixiert (Nähseide Nr. 4). Abweichend von IVY, BRAGG und STEPHENSON (1968), die mit Hilfe von Manschetten das Röhrchen in der Operationswunde zu fixieren suchen, wird in vorliegendem Falle die Klemme abgenommen, der gequetschte Darmteil abgeschnitten und der jetzt über den Fixationsheften frei liegende Darmteil aufgerollt und die Darmschleimhaut mit der Epithelschicht der äußeren Haut mit 10 - 15 Heften fein vernäht.

Nun wird das Peritonäum mit einer fortlaufenden Naht verschlossen, dann einzeln Muskulatur und Haut mit U-Nähten, wobei ein sehr gut heilender Wundkamm entsteht, der sich im Laufe von vier Wochen völlig zurückbildet. Vor und hinter das Röhrchen setzt man je eine enganliegende Knopfnaht, um eine endgültige Fixation des Röhrchens zu gewährleisten (Abb. 4). Nach ca. 1 bis 1 1/2 Stunden steht das Tier wieder fest auf den Beinen. Für genügend Wärme ist Sorge zu tragen.

Postoperativ wird jedem Huhn 1,5 ml Terramycin i.m. verabreicht, ebenfalls an den beiden darauffolgenden Tagen, um einer möglichen Infektion vorzubeugen. Da das "Parkesernyl" symphathomimetische Nebenwirkungen besitzt, ist in den ersten Tagen nach der Operation auf den Kotabfluß aus dem Röhrchen zu achten. Sollte dieser nicht oder nur ungenügend stattfinden, was in allen hier vorliegenden Fällen zutraf, wird den Tieren ebenfalls an drei aufeinanderfolgenden Tagen ein Parasympathomimeticum appliziert und zwar 0,3 ml "Lentin" in einer 1 : 10 Verdünnung der handelsüblichen Form von 0,01 %. Die Wirkung ist überzeugend.

Da bei einigen Tieren nach vier Tagen ein stinkender Durchfall auftrat, wurde dicksaure Magermilch zugefüttert, um die Darmflora zu normalisieren, was meist drei bis vier Tage benötigt.

Versuche mit Röhrchen aus normalen, handelsüblichen Kunststoffen, führen aufgrund deren Gehalt an Fettsäureamiden, Phenol und schwefelhaltigen Substanzen (Auskunft eines Kunststoffherstellers) spätestens am dritten Tage post operationem zum Exitus, wobei in allen Fällen folgender

Sektionsbefund ermittelt wird:

Dunkelrotfärbung der gesamten Darmschleimhaut mit deutlichen, tiefgreifenden, herdförmigen Nekrosen, Schwellungen und Nekrosen der äußeren Haut an den Stellen, an denen sie mit dem eingesetzten Röhrchen in Verbindung steht.

c) Kollektion des Harnes

Auch die Harnkollektion wird gegenüber den in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten verändert. Die Tiere stehen in vorliegendem Falle nicht auf zur Mitte hin geneigten Böden, sondern nach der Operation werden den Hennen kreisförmig um die Kloake herum mit einem dicken Seidenfaden Ösen in die Haut genäht, die zum Aufhängen des Harnsammelbeutels dienen. Als Harnsammelbeutel eignen sich die kleinsten Größen von handelsüblichen Tiefkühlbeuteln. Sie werden auf eine Größe von 15 x 18 cm zurechtgeschnitten und ihre Öffnung mit einem doppelten Leukoplaststreifen verstärkt. Nachdem ein weiterer dicker Faden durch den Rand des Beutels und durch die Ösen um die Kloake gezogen ist, kann man den Harnsammelbeutel wie einen Tabaksbeutel um die Kloake zusammenziehen und den 12-Stundenharn eines Huhnes sammeln. Da einzelne Hennen aufgrund des steigenden Gewichtes des Beutels, der dadurch einen Zug auf die Haut ausübt, den Harnsammelbeutel aufpicken, muß der ganze Beutel mit Leukoplaststreifen umwickelt werden.

d) Verluste

Durch das für Vögel sehr gut verträgliche "Parkesernyl" kommt es zu keinen Narkoseausfüllen. Die Gesamtverluste betragen 5 Tiere von 35 operierten Hennen = 14,3 %.

Bei deren Sektion wird folgender Befund erhoben:

3 Tiere (Tod am dritten Tag) hochgradige Peritonitis

1 Tier (Tod am siebten Tag) makroskopisch kein Befund, bakteriologisch +++ Escherichia coli.

1 Tier (Tod am 14. Tag. Das Tier ist infolge mangelnder Futteraufnahme und zunehmender Schwäche über 6 Tage stündlich mit einer Traubenzuckerlösung künstlich ernährt worden.)
Allgemeine Kachexie.

2. Blutuntersuchung

Die Blutentnahme erfolgt bei allen operierten Tieren für die Bestimmung von Magnesium, Gesamteiweiß, anorganischer Phosphor und Calcium vom Versuchsbeginn bis zu Versuchsende in Zeitabständen von einer Woche durch Punktion der Vena cutanea ulnaris. Zur Hemmung der Blutgerinnung wird Ammoniumheparinat verwendet.

Nach Zentrifugieren des Blutes bei 3000 U/min 20 min lang, werden im Blutplasma die einzelnen Blutbestandteile nach folgenden Methoden bestimmt:

1. Magnesium:	mit Hilfe des Photometers der Firma Eppendorf nach KOLTHOFF (1927), modifiziert nach HAURY (1965) Testpackung der Fa. Haury
2. Gesamteiweiß:	photometrisch mit Hilfe des Biuretreagens nach WEICHSELBAUM (1946)
3. anorganischer Phosphor:	photometrisch nach KURZWEG und MASSMANN (1962) Testpackung der Fa. Asal
4. Calcium:	mit Hilfe des Flammenphotometers der Fa. Eppendorf

3. Knochenuntersuchungen

Nach Entnahme der Tibien aus dem Körperverband und nach Entfernen der Weichteile wird das Frischgewicht der Tibien bestimmt, nach dreistündiger Trocknung bei 110° C im Trockenschrank das Trockengewicht sowie nach 10-stündiger Veraschung im Muffelofen bei 600° C das Aschegewicht.

Die Bestimmung des Gehaltes an Calcium der Knochenasche erfolgt nach der Methode von SCHNEIDER (1954) und die Bestimmung des Phosphates nach der Methode von SCHNEIDER und BARTH (1960).

I. Calciumbestimmung nach SCHNEIDER (1954)

Auf dem Sandbad wird die Knochenasche mit H Cl erhitzt und bis zur Geruchlosigkeit eingedampft. Mit 2 ml H Cl wird die Asche aufgenommen und mit Wasser in 200 ml Meßkolben überführt, was mit äußerster Sorgfalt zu geschehen hat (mehrmals spülen) da sonst große Ungenauigkeiten auftreten. Die Kolben werden bis zur Eichmarke mit Wasser aufgefüllt. (Aufschlußlösung) 50 ml der Aufschlußlösung werden in ein 100 ml Kölbchen pipettiert und mit folgendem Gemisch bis zur Eichmarke aufgefüllt:

In einem Verhältnis von 4 : 1 Teilen werden gemischt: (Reaktionslösung)

1. 1 kg Zitronensäure
   3,5 kg NH_3, d = 0,91
   zu 10 Litern Wasser

2. 700 g $Mg\ Cl_2$
   500 g $NH_4\ Cl$
   auf 10 Liter mit Wasser auffüllen

Das Gemisch von Aufschluß- und Reduktionslösung wird gut geschüttelt und bei Zimmertemperatur stehen lassen. Nach 12 Stunden schüttelt man nochmals und filtriert den ausgefallenen Phosphor ab. Mit Hilfe des Flammenphotometers wird nun der Calciumgehalt bestimmt.

II. Phosphorbestimmung nach SCHNEIDER und BARTH (1960)

Aus der Aufschlußlösung werden 5 ml in ein 100 ml Kölbchen pipettiert und 7 ml verdünnte Schwefelsäure (71,3 ml $H_2\ SO_4$ konz. auf 1 l Wasser) zugefügt. Dann wird auf dem Sandbad eingedampft, bis nur noch 2 Tropfen im Kölbchen enthalten sind. Dabei ist genauestens darauf zu achten, daß diese Menge von 2 Tropfen nicht unterschritten und der Kolbeninhalt nicht trocken wird. Im Warmzustand wird etwas Wasser und 30 ml folgenden Gemisches hinzugefügt:

1. 1 l H NO_3 (1 Teil H NO_3 und 2 Teile Wasser)
2. NH_4 VO_3, 0,25 %-tig, hergestellt aus 2,5 g NH_4 VO_3, gelöst in 500 ml siedendem Wasser und 20 ml H NO_3, die nach Erkalten zugegeben wird. Anschließend wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.
3. Ammoniummolybdatlösung, 5 %-tig, hergestellt wie folgt: 50 g $(NH_4)_6$ Mo_7 O_{24} x 4 H_2 O in 800 ml Wasser bei 50° C lösen.
   Nach Erkalten auf 1 l Wasser auffüllen.

Diese drei Lösungen werden zu gleichen Teilen in der aufgeführten Reihenfolge gemischt und der zu messenden Lösung zugefügt. Der Kolbeninhalt färbt sich stark orangefarben. Der Kolben wird nun mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt, gut geschüttelt und nach einer 1/2 Stunde mit dem Photometer gemessen. (Hg 436 nm)

Die Umrechnung der Extinktionswerte erfolgt anhand einer Eichkurve.

4. Harnuntersuchung

Pro Tier wird jede Woche einmal der 12-Stundenharn gesammelt und auf folgende Inhaltsstoffe hin untersucht:

a) Calcium:

Mit Hilfe des Flammenphotometers der Firma Eppendorf nach der Betriebsanleitungsschrift zum Flammenphotometer.

b) 17-Ketosteroide gesamt:

photometrisch nach der Methode von ZIMMERMANN (1951)
Testpackung der Firma Haury
Laut Arbeitsanleitung zu dieser Testpackung ist diese Methode nur wenig spezifisch, da schon beim ersten Schritt, der Säurehydrolyse, im Harn vorhandene 17-Ketosteroide zerstört und ursprünglich nicht vorhandene sogenannte "Schein-17-Ketosteroide" auftreten können. Man spricht daher besser von "Zimmermann Chromogenen" und nicht von 17-Ketosteroiden. Da der Ausdruck jedoch in der Literatur geläufig ist, wird er auch in vorliegender Arbeit beibehalten.

c) 11-oxygenierte 17-Ketosteroide:

Nach der Methode von GRAEF und STAUDINGER (1967)

d) 17-Hydroxycorticosteroide:

photometrisch nach POTTER und SILBER (1950)
Testpackung der Firma Haury

5. Berechnung der Ergebnisse

a) Mittelwerte nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^{N} \times x_i$$

b) Standardabweichungen nach der Formel

$$s^2 = \frac{SAQ}{FG} \qquad s = \sqrt{\frac{SAQ}{FG}}$$

$$SAQ = \sum_{i=1}^{N} \times (x_i - \bar{x})^2 =$$

$$\sum_{i=1}^{N} x^2 - \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^{N} \times x_i \right)^2$$

c) Berechnung der Signifikanz mit dem t = Test nach Student

$$s_d^2 = \frac{SAQ_1 + SAQ_2}{N_1 + N_2 - 2}$$

$$t = \frac{x_1 - x_2}{s_d} \times \sqrt{\frac{N_1 \times N_2}{N_1 + N_2}}$$

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Um eine unterschiedliche Immobilisation der Tiere zu erreichen, werden 15 operierte Hennen in Einzelkäfige von einer Größe von 11 x 40 cm und 15 weitere operierte Tiere zu je vier (drei) Hennen in Käfige von einer Größe von 85 x 74 cm gesetzt. Während der gesamten Versuchsdauer erhalten die Tiere handelsübliches Legehennenalleinfutter (pellets) und Wasser ad lib..

Die Tiere werden im Alter von 19 Wochen zum Versuch aufgestellt, so daß jedes Tier mindestens vier Wochen nach der Operation in normal großen Käfigen steht, um sich von eventuellen Folgen der Operation zu erholen.

Vor Versuchsbeginn, im Alter von 18 Wochen, werden von jedem Tier Blut- und Harnproben zur Untersuchung entnommen. Sie sind in den Ergebnistabellen im Alter von 18 Wochen registriert.

Die Versuchsdauer beträgt 10 Wochen, während der die Tiere laufend beobachtet werden. Einmal wöchentlich wird jedes Tier gründlich klinisch untersucht. Ebenfalls einmal wöchentlich werden die zu untersuchenden Blut- und Harnproben entnommen.

Nach dieser Zeit werden alle Tiere getötet, pathologisch-anatomisch untersucht und Untersuchungsmaterial entnommen.

Während der gesamten Versuchsdauer wird eine Legetätigkeit der Hennen nicht beobachtet.

ERGEBNISSE

1. Verhalten der Hennen

a) im engen Käfig

Die Tiere sind in den ersten Tagen sehr aufgeregt, gewöhnen sich dann aber sehr gut an die Enge. Während des gesamten Versuchsablaufes kann niemals beobachtet werden, daß sich die Tiere umdrehen.

b) im großen Käfig

Die Hennen im großen Käfig zeigen kein physiologisch abweichendes Verhalten.

2. Körpergewichte (s. Tab. 1)

Das durchschnittliche Körpergewicht der Hennen in den engen Käfigen zeigt bis zur vierten Versuchswoche einen deutlichen Anstieg (von 1085 g auf 1286 g) und fällt dann bis zum Versuchsende kontinuierab. (989 g)

Das Durchschnittsgewicht der Hennen im großen Käfig hingegen steigt von Versuchsbeginn bis zum Versuchsende kontinuierlich an. (von 1037 g auf 1545 g)

3. Blutuntersuchungen (s. Tab. 2)

a) Gesamteiweiß:

Bei beiden Versuchsgruppen können keine Veränderungen der Eiweißwerte nachgewiesen werden.

b) Magnesium:

Die Magnesiumblutwerte der Tiere im engen Käfig liegen bis zur zweiten Versuchswoche signifikant höher als die der Hennen im großen Käfig ($t > 1\ \%$), fallen in der dritten Versuchswoche dann plötzlich ab ($t > 5\ \%$), um von der fünften Versuchswoche an wieder signifikant über den Werten der Tiere im großen Käfig zu liegen ($t < 2\ \%$). In der 10. Versuchswoche fallen die Werte der Tiere im engen Käfig wiederum ab ($t > 5\ \%$).

c) anorganischer Phosphor:

Bis zur sechsten Versuchswoche läßt sich bei den Phosphorwerten der Tiere in beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied nachweisen. Von der achten Versuchswoche an jedoch steigt der Blutphosphorgehalt der Tiere im engen Käfig bis zum Versuchsende schwach signifikant an. ($t > 2\ \%$).

d) Calcium:

Bei den Calciummittelwerten kann bei den Hennen im großen Käfig ein stetiger Anstieg festgestellt werden, während der Blutcalciumspiegel der Hennen im engen Käfig konstant bleibt.

Ab der fünften Versuchswoche liegen die Calciumwerte der Hennen im großen Käfig hochsignifikant über denen der Hennen im engen Käfig. ($t < 0,1\ \%$)

4. Harnuntersuchungen (s. Tab. 3 - 5)

Die gesammelten 12-Stundenmengen sind unterschiedlich. Die Mittelwerte liegen bei 44,6 g Harn. Die Randwerte betragen 13,0 bzw. 153,4 g.

a) pH-Werte: (s. Tab. 3)

Mit einem pH-Meter der Firma Knick werden unmittelbar nach der Probenentnahme die pH-Werte des Harns gemessen, wobei die Werte der Tiere im engen Käfig hochsignifikant über denen der Tiere im großen Käfig liegen.

b) Calcium: (s. Tab. 3)

Die Calciummittelwerte im Harn ergeben eine gleiche Menge Calcium bei beiden Versuchsgruppen bis zur zweiten Versuchswoche. Von da ab bleiben die Calciumwerte der Tiere im großen Käfig konstant, während die Werte der Tiere im kleinen Käfig kontinuierlich bis zu einer Menge von 641 ppm ansteigen.

c) anorganischer Phosphor (s. Tab. 3)

Die Phosphorausscheidung im Harn ist bei beiden Versuchsgruppen über die Dauer des Versuches nicht signifikant unterschiedlich.

d) 17-Ketosteroide im Gesamten: (s. Tab. 4 und 5)

(Zimmermann Chromogene)
Die Ausscheidungsmenge der Zimmermann Chromogene geht bei beiden Versuchsgruppen von denselben Werten aus (70,6 ppm und 75,5 ppm). In der zweiten Versuchswoche steigt die Ausscheidungsrate der Tiere im engen Käfig hochsignifikant über die der Tiere im großen Käfig (t 0,1 %). Der Anstieg der 17-Ketosteroide dauert bis zur fünften Versuchswoche an, um dann ebenso schnell wieder auf die Ausgangswerte abzufallen.
(Ausgangswerte: 78,5 ppm und 77,4 ppm)

e) Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie: (s. Tab. 4 und 5)

Dieselbe Entwicklung der Ausscheidungsrate wie bei den gesamten 17-Ketosteroiden läßt sich auch bei den vier einzeln isolierten 11-oxygenierten 17-Ketosteroiden beobachten. Die Werte steigen bei den Tieren im engen Käfig bis zur fünften Versuchswoche an und fallen bis zum Versuchsende wieder ab.

Bei den Tieren im großen Käfig tritt folgendes Phänomen auf:

Bei allen vier einzeln isolierten 17-Ketosteroiden erfolgt in der zweiten und in der sechsten Versuchswoche ein plötzlicher Anstieg der Ausscheidung. Bei der nächsten Probeuntersuchung tritt ein ebenso plötzlicher Abfall ein.
(Anstieg von 10,7 ppm auf 35,5 ppm in der zweiten Versuchswoche und von 12,9 ppm auf 66,7 ppm in der sechsten Versuchswoche).

f) 17-Hydroxycorticosteroide

Mit Hilfe der Testpackung "17-Hydroxycorticoticosteroide" der Firma Haury können im Harn der Versuchshennen keine 17-Hydroxycorticosteroide nachgewiesen werden.

5. Knochenuntersuchungen (s. Tab. 6)

a) Frisch- und Trockengewichte der Tibien:

Bei den durchschnittlichen Frisch- und Trockengewichten der Tibien der beiden Versuchsgruppen läßt sich kein Unterschied feststellen (t $\geq$ 5 %)

b) Aschegewicht

Das Tibiaaschegewicht der Hennen im engen Käfig liegt hochsignifikant unter dem der Hennen im großen Käfig. ($t < 1\ \%$)

c) relativer Calciumgehalt der Knochenasche

Der relative Calciumgehalt, bezogen in % auf das Aschegewicht der Knochen ist bei den Tieren im engen Käfig hochsignifikant erniedrigt gegenüber den Tieren im großen Käfig. ($t \leqslant 0,1\ \%$)

d) relativer Phosphorgehalt der Knochenasche:

Der Phosphorgehalt der Knochenasche bei den beiden Versuchsgruppen zeigt keine signifkanten Unterschiede. ($t > 5\ \%$)

Tabelle I

Körpergewichte

Alter in Wochen	großer Käfig	kleiner Käfig
18	1037 ± 92,70	1085 ± 56,55
19	1086 ± 78,54	1166 ± 79,36
20	1150 ± 86,13	1226 ± 69,97
21	1190 ± 94,04	1286 ± 84,30
22	1126 ± 109,15	1197 ± 47,61
23	1278 ± 99,05	1252 ± 77,14
24	1318 ± 93,88	1181 ± 70,94
25	1358 ± 96,14	1075 ± 104,04
26	1423 ± 97,00	1036 ± 198,29
27	1470 ± 107,60	1017 ± 73,36
28	1545 ± 116,55	989 ± 36,14

Tabelle II

	großer Käfig			
Alter in Wochen	Gesamteiweiß g %	Magnesium ppm	anorgan. Phosphor	Ca p
18	4,84 ± 0,38	37,7 ± 4,20	36,9 ± 4,80	93 -
19	4,91 ± 0,84	35,3 ± 10,65	35,1 ± 4,30	105 -
20	5,24 ± 0,68	35,8 ± 3,36	25,1 ± 3,04	123 -
21	5,11 ± 0,84	35,7 ± 2,49	33,0 ± 5,70	119 -
22	4,49 ± 0,83	45,0 ± 13,16	38,1 ± 6,37	145 -
23	4,87 ± 0,83	29,5 ± 4,86	40,9 ± 4,89	154 -
24	4,66 ± 0,57	38,1 ± 5,03	39,7 ± 4,97	157 -
25	4,59 ± 0,59	32,7 ± 5,41	39,5 ± 4,18	166 -
26	4,76 ± 0,70	36,1 ± 3,62	36,9 ± 5,70	179 -
27	4,79 ± 0,50	35,7 ± 2,56	38,6 ± 4,27	192 -
28	4,67 ± 0,59	38,8 ± 13.45	38,8 ± 4,18	204 -

rsuchungsbefunde

kleiner Käfig			
Gesamteiweiß g %	Magnesium ppm	anorgan. Phosphor	Calcium ppm
4,27 ± 1,72	40,7 ± 9,56	35,7 ± 9,37	122 ± 7,61
5,20 ± 0,54	52,7 ± 6,44	33,1 ± 13,04	112 ± 11,74
5,63 ± 0,53	51,8 ± 12,38	27,9 ± 12,10	123 ± 44,02
5,32 ± 0,76	41,5 ± 4,06	32,2 ± 8,13	127 ± 19,92
4,68 ± 0,85	41,8 ± 6,22	35,7 ± 6,14	124 ± 46,88
4,98 ± 0,58	50,8 ± 9,34	37,2 ± 4,39	126 ± 26,38
4,77 ± 0,41	51,7 ± 8,09	38,9 ± 7,29	126 ± 28,28
4,45 ± 0,36	46,7 ± 7,72	44,4 ± 4,14	117 ± 6,85
4,53 ± 0,36	45,8 ± 6,45	42,8 ± 10,15	118 ± 5,00
4,42 ± 0,31	46,1 ± 6,31	44.4 ± 7,33	115 ± 5,00
4,36 ± 0,17	42,0 ± 3,91	45,9 ± 5,75	114 ± 4,69

Tabelle 3 Harnuntersuchungsbefunde I

	großer Käfig		kleiner Käfig	
Alter in Wochen	pH-Werte	Calcium ppm	pH-Werte	Calcium ppm
18	5,59 ± 0,28	199 ± 54,62	6,60 ± 0,28	198 ± 28,61
19	5,85 ± 0,33	192 ± 26,17	6,79 ± 0,28	169 ± 27,52
20	5,87 ± 0,33	172 ± 22,61	6,60 ± 0,26	176 ± 16,31
21	5,97 ± 0,75	180 ± 32.72	6,84 ± 0,43	437 ± 38,80
22	5,86 ± 0,34	183 ± 26,48	6,54 ± 0,33	597 ± 58,66
23	6,01 ± 0,58	184 ± 12,30	6,56 ± 0,70	668 ± 42,66
24	5,88 ± 0,37	179 ± 18,50	6,68 ± 0,44	637 ± 20,62
25	5,85 ± 0,38	185 ± 25,39	6,63 ± 0,14	615 ± 14,48
26	5,77 ± 0,42	193 ± 26,75	6,63 ± 0,42	611 ± 18,45
27	5,79 ± 0,41	195 ± 32,02	6,76 ± 0,20	640 ± 14,91
28	5,81 ± 0,46	186 ± 23,68	6,63 ± 0,33	641 ± 21,80

Tabelle 4 Harnuntersuchungsbefunde II

	Hormone der Tiere im großen Käfig				
Alter in Wochen	17-Ketosteroide gesamt	11-Ketoätiocholanolon	ß-Hydroxyätiocholanolon	11-Ketoandrosteron	11-ß-Hydroxyandrosteron
18	70,6 ± 0,78	18,6 ± 0,24	10,5 ± 0,14	11,1 ± 0,17	11,4 ± 0,14
19	68,4 ± 1,53	18,1 ± 0,41	10,5 ± 0,14	10,7 ± 0,26	11,7 ± 0,14
20	77,4 ± 5,30	37,7 ± 1,53	31,9 ± 0,51	35,5 ± 0,53	38,1 ± 0,34
21	77,7 ± 1,56	20,1 ± 0,39	11,2 ± 0,20	10,8 ± 0,47	15,4 ± 0,32
22	77,3 ± 1,91	17,1 ± 0,39	10,3 ± 0,10	13,5 ± 0,10	14,0 ± 0,20
23	77,8 ± 1,29	17,2 ± 0,39	11,1 ± 0,22	12,9 ± 0,17	14,4 ± 0,22
24	74,5 ± 0,76	59,2 ± 1,20	14,7 ± 0,51	66,7 ± 0,85	37,6 ± 1,23
25	71,7 ± 0,51	17,9 ± 0,83	10,3 ± 0,28	12,7 ± 0,22	13,8 ± 0,32
26	76,5 ± 1,25	17,7 ± 0,28	11,4 ± 0,26	12,6 ± 0,17	13,9 ± 0,36
27	74,9 ± 1,56	15,4 ± 0,37	11,5 ± 0,28	12,8 ± 0,22	13,6 ± 0,17
28	78,5 ± 1,76	15,7 ± 0,26	10,9 ± 0,22	11,9 ± 0,17	12,8 ± 0,14

Tabelle 5 Harnuntersuchungsbefunde III

	Hormone der Tiere im kleinen Käfig				
Alter in Wochen	17-Ketosteroide gesamt	11-Ketoätio-cholanolon	ß-Hydroxyätio-cholanolon	11-Ketoandro-steron	11-ß-Hydroxy-androsteron
18	75,5 ± 1,35	17,6 ± 0,47	15,5 ± 0,10	12,9 ± 0,10	12,1 ± 0,17
19	77,9 ± 1,52	19,9 ± 0,73	39,5 ± 1,38	58,1 ± 1,71	27,7 ± 0,35
20	119,6 ± 1,73	36,9 ± 0,49	42,7 ± 1,57	71,4 ± 1,38	41,9 ± 1,26
21	149,3 ± 1,40	80,2 ± 0,42	48,6 ± 1,84	76,7 ± 1,23	60,1 ± 1,06
22	162,2 ± 4,39	90,1 ± 0,68	60,0 ± 1,02	81,1 ± 1,46	79,7 ± 0,48
23	157,4 ± 4,34	75,0 ± 0,53	60,9 ± 1,32	62,9 ± 2,87	65,2 ± 0,52
24	149,5 ± 3,80	34,4 ± 0,32	60,0 ± 1,50	31,1 ± 0,40	31,0 ± 0,59
25	106,7 ± 1,34	24,9 ± 0,40	44,6 ± 1,14	14,6 ± 0,35	27,7 ± 0,48
26	85,1 ± 2.00	19,4 ± 0,35	16,5 ± 0,70	13,4 ± 0,56	23,8 ± 0,32
27	69,9 ± 1,53	18,7 ± 0,55	11,8 ± 0,48	10,8 ± 0,26	16,9 ± 0,30
28	77,4 ± 1,16	18,4 ± 0,41	11,8 ± 0,36	9,3 ± 0,20	17.0 ± 0,24

Tabelle 6

Knochenbefunde

	großer Käfig	kleiner Käfig
1. Tibiafrischgewicht in g	10,09 ± 1,61	10,26 ± 8,26
2. Tibiatrockengewicht in g	6,62 ± 1,27	6,30 ± 2,29
3. Tibiaaschegewicht in g	3,49 ± 0,67	2,31 ± 0,46
4. Relativer Ca-Gehalt in %	32,06 ± 3,00	26,19 ± 2,77
5. Relativer p-Gehalt in %	12,64 ± 3,94	13,35 ± 1,82

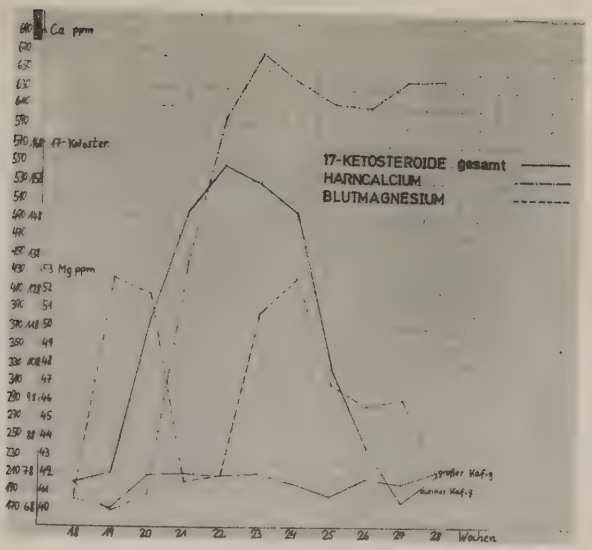

Abbildung 5

Harncalcium und Blutmagnesium der Gruppe I
17-Ketosteroide beider Versuchsgruppen

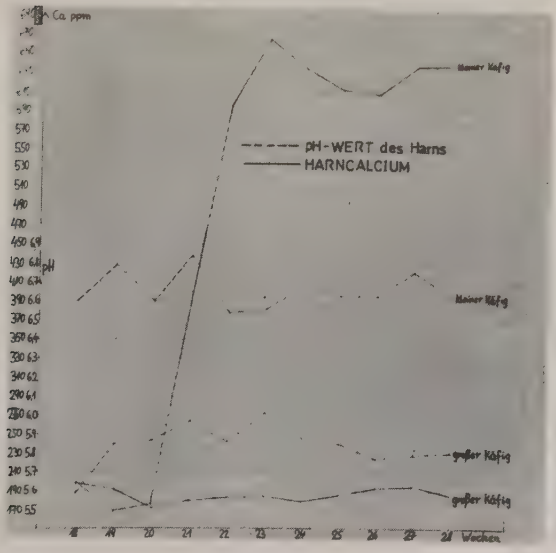

Abbildung 6

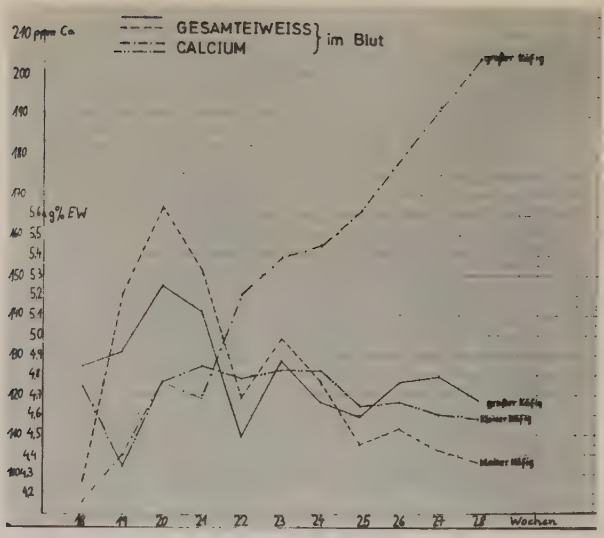

Abbildung 7

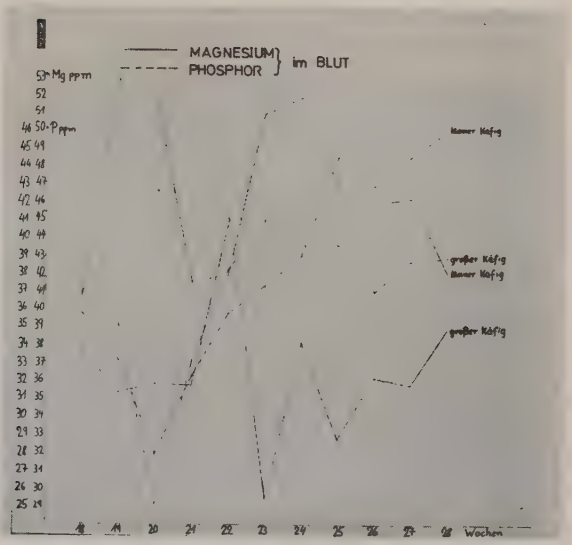

Abbildung 8

DISKUSSION

Nach dem Einstallen der Tiere in zwei verschiedene Käfiggrößen werden folgende Befunde erhoben:

(kleiner Käfig = Gruppe 1 ; großer Käfig = Gruppe 2)

Außer den von vorneherein von Tier zu Tier individuell stark schwankenden pH-Werten des Urins, sind bei den analysierten Inhaltsstoffen des Harns und des Blutes bei den Tieren im großen und im kleinen Käfig keine signifikant unterschiedlichen Ausgangswerte festzustellen.

Während der gesamten Versuchsdauer zeigen die Werte der vier einzeln isolierten 17-Ketosteroide im Harn der Tiere der Gruppe 1 denselben Kurvenverlauf wie die der in toto bestimmten 17-Ketosteroide. Aus Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß der Anstieg der iver einzeln isolierten 17-Ketosteroide jedoch steiler ist als der der gesamt bestimmten.

Auch bei der Gruppe 2 folgen die Werte der vier einzeln isolierten 17-Ketosteroide denen der gesamten, außer zwischen der ersten und zweiten und der fünften und sechsen Versuchswoche. Hier wird nur bei den vier einzeln isolierten 17-Ketosteroiden ein Anstieg auf das Doppelte bzw. Dreifache der Ausgangswerte beobachtet, eine Erscheinung, die bei der Bestimmung der gesamten 17-Ketosteroide nicht auftritt. Dieser plötzliche Anstieg und ebenso plötzliche Abfall bei der darauffolgenden Messung, der bei allen Tieren der Gruppe 2 auftritt, ist ungeklärt. Die hier diskutierten Werte der 17-Ketosteroide beziehen sich im wesentlichen auf die in toto analysierten 17-Ketosteroide.

Die Magnesiumwerte der Tiere im großen Käfig sind starken Schwankungen unterworfen, die aus den ungeklärten, zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten festgestellten Standardabweichungen resultieren. Ein echter Anstieg der Magnesiumwerte der Tiere im großen Käfig findet nur zwischen der 21. und 22. Lebenswoche statt, zu dem Zeitpunkt, zu dem das Blutcalcium der Hennen im großen Käfig den für Legebeginn charakteristischen Anstieg erfährt.

Bereits in der ersten Versuchswoche steigen die Blutmagnesiumwerte ebenso wie die Werte des Blutgesamteiweißes der Tiere im engen Käfig steil an. Die Werte der 17-Ketosteroide im Harn zeigen bei Gruppe 1 eine leichte, aber noch nicht signifikant zunehmende Tendenz. Dieser steigenden Tendenz folgt auch die Gruppe 2, allerdings erst nach anfänglichem, leichten Absinken und nur in der zweiten Versuchswoche, dann bleibt der Spiegel etwa auf gleichem Niveau. Als Sofortreaktion auf die Immobilisation kann demnach nur der Anstieg der Magnesiumwerte im Blut angesprochen werden. In der zweiten Versuchswoche beginnt die 17-Ketosteroidausscheidung im Harn von Gruppe 1 rasch und intensiv anzusteigen, während gleichzeitig das Blutmagnesium zunächst einen leichteren, später aber stärkeren Abfall erfährt. Das Gesamteiweiß erreicht am Ende der zweiten Woche während der plötzlich vermehrten Steroidausscheidung den höchsten Stand während der gesamten Versuchsdauer. Ein ähnlicher, aber weniger hoher Gipfel des Gesamteiweißes wird zum selben Zeitpunkt auch bei Gruppe 2 nach geringgradiger Anhebung der 17-Ketosteroidwerte im Harn gesehen. Zu dem Zeitpunkt stärkster Ausschüttung der 17-Ketosteroide wird für den Blutmagnesiumgehalt in Gruppe 1 ein Minimalwert ermittelt. Obwohl die 17-Ketosteroide im Harn von Gruppe 2 ab der zweiten Versuchswoche in gleichmäßiger Menge im Harn erscheinen, ist dies beim Magnesiumgehalt des Blutes nur kurze Zeit der Fall. Dieser unterliegt im weiteren Verlauf großen Schwankungen.

Dem starken Anstieg der 17-Ketosteroide im Harn der Tiere im kleinen Käfig folgt genau eine Woche später eine ebenso plötzliche und steile Zunahme der Harncalciumausscheidung, die auch ihren Gipfel erst eine Woche nach der 17-Ketosteroidspitze erreicht. Im großen Käfig bleiben sowohl die 17-Ketosteroidausscheidung als auch die Harncalciumwerte während des weiteren Versuchsablaufes auf einem Niveau.

In der fünften Versuchswoche beginnt zunächst ein schwacher, später deutlicher Abfall der 17-Ketosteroidausscheidung in Gruppe 1, der bis zur 9. Versuchswoche den Ausgangswert erreicht.

Mit der Abnahme der Harn-17-Ketosteroide geht zunächst ein steiler Anstieg des Blutmagnesiumgehaltes innerhalb von zwei Wochen einher, der dann wieder abfällt und in der 10. Versuchswoche (wiederum eine Woche nach Erreichung des Normniveaus der 17-Ketosteroide) ebenfalls seinen Ausgangswert erreicht. In den ersten sechs Versuchswochen bilden demnach die Blutmagnesiumwerte und die Werte der 17-Ketosteroidausscheidung der Gruppe 1 eine

alternierende Kurve. Dem Rückgang der 17-Ketosteroidausscheidung folgt allerdings die Calciumharnausscheidung, eine Woche später beginnend, nur zwei Wochen lang, dann bleibt sie auf einen konstant hohen Niveau.

In dem Augenblick, in dem die Blutmagnesiumwerte bei den Tieren im kleinen Käfig stark abfallen, fallen auch die Gesamteiweißwerte des Blutes. Ein ähnlicher Gleichklang ist bei den Tieren im großen Käfig nicht zu sehen. Andererseits verlaufen die Eiweißwerte in beiden Gruppen so ähnlich, daß eine Abhängigkeit derselben von den Magnesiumwerten des Blutes mit Sicherheit verneint werden kann.

Immerhin ist erwähnenswert, daß in beiden Gruppen die höchsten Gesamtbluteiweißwerte gleichzeitig mit den niedrigsten Phosphorwerten auftreten. Bei Gruppe 1 erreichen die Phosphorwerte ihren niedrigsten Stand zu dem Zeitpunkt, zu dem der Magnesiumabfall beginnt. Auch eine derartige Beziehung läßt sich bei Gruppe 2 nicht finden.

Während des zunächst leichten Anstieges der 17-Ketosteroide der Gruppe 1 in der ersten Versuchswoche, sinkt das Blutcalcium gleichzeitig mit dem Harncalcium ab. Dann nehmen beide zu, aber während das Harncalcium eine Spitze erreicht, pendelt sich das Blutcalcium auf ein Niveau ein. Dies geschieht im großen Käfig nicht. Hier steigt das Blutcalcium weiter an.

Am stärksten beeindruckt die bald nach der vermehrten 17-Ketosteroidausscheidung der immobilisierten Gruppe einsetzende erhöhte Calciumausscheidung mit dem Harn. Dieser Vorgang bestätigt die von anderen Autoren wiederholt ausgesprochene Vermutung, daß eine starke Aktivierung der Nebennierenrindenglucocorticoide eine wesentlich erhöhte Calciumharnausscheidung zur Folge hat.
(BARTTER, 1957; AHO und HERRALA, 1959; MOLINATTI, CAMANNI und OLIVETTI, 1960).

Sie beweist ferner, daß eine sehr erhebliche Bewegungseinschränkung sehr bald zu einer Aktivierung der Nebennierenrinde und zu vermehrter Ausscheidung von 17-Ketosteroiden im Harn führt. Die hiermit in Zusammenhang stehende vermehrte Ausscheidung von Calcium im Harn hat die durch die Knochenanalyse festgestellte Demineralisierung bzw. Osteoporose zur Folge.

Der Rückgang der 17-Ketosteroide, ebenso drastisch wie zu Versuchsbeginn ihr Anstieg, ohne gleichzeitige Senkung der Calciumharnausscheidung, ist bis jetzt nicht in der Literatur beschrieben. Ab einem kritischen Punkt werden immer weniger 17-Ketosteroide ausgeschieden. Ursache kann eine Adaption oder eine Erschöpfung der Nebenniere sein. Die durch Aktivierung der Nebennierenrinde ausgelöste Calciumausscheidung im Harn benötigt aber anscheinend zu ihrer Unterhaltung nicht die Nebennierenrindenhormone. Nach anfänglichem Rückgang bleiben die Calciumwerte auch nach Absinken der Hormonausscheidung im Harn auf einem annähernd konstant erhöhten Niveau. Zu dem Zeitpunkt, da sich die Calciumausscheidung auf ein hohes Niveau einpendelt, sind sowohl die 17-Ketosteroidwerte im Harn als auch die Blutmagnesiumwerte bereits stark zurückgegangen. Inwieweit nun das Magnesium, dem im Mineralstoffwechsel von TAYLOR et al. (1960), BACHRA, TRAUTZ und SIMON (1965) und von SCHMIDT (1968) eine direkte Beziehung zum Calcium zugewiesen wird, an der Unterhaltung der Calciumharnausscheidung oder an den Demineralisierungsvorgängen beteiligt ist, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse nicht geklärt werden. Es könnte sein, daß die erhöhten Blutmagnesiumwerte wenigstens zeitweise eine Hemmung im Regulationsmechanismus der Knochenmineralisierung auslösen.

Für den hohen Magnesiumblutspiegel, den auch PILASKI (1970) bei seinen immobilisierten Versuchshennen findet, allerdings über die gesamte Versuchsdauer erhöht und außerdem verbunden mit erniedrigten Werten der alkalischen Phosphatase, gibt es einige Erklärungsmöglichkeiten.

Nach POTEL (1969) stellen Magnesiumionen einen wichtigen Aktivator für Acetylcholin dar und damit für die neuromuskuläre Erregungsübertragung. Da die Tiere im engen Käfig bei weitem nicht soviel Muskelarbeit verrichten wie die Tiere im großen, werden möglicherweise weniger Magnesiumionen zur Aktivierung von Acetylcholin benötigt. Dasselbe, was für Acetylcholin gilt, trifft auch für die alkalische Phosphatase zu. (POTEL, 1969; SCHEUNERT, TRAUTMANN, 1965)

Die Blutcalciumwerte der Tiere im engen Käfig sind über die gesamte Versuchsdauer konstant, was in der Literatur bei ähnlicher Versuchsdurchführung bestätigt wird. (ICHIKI und USUI 1966; MOLINATTI, CAMANNI und OLIVETTI 1960 und LAAKE 1961). Dies spricht für ein Nichtbeteiligtsein von Parathormonen.

Die kontinuierlich ansteigende Blutcalciumkurve der Tiere im großen Käfig kann mit der zunehmenden Geschlechtsreife der Vögel erklärt werden, bei denen dieser Vorgang bekannt ist.

Eine extrem negative Beeinflussung des Körpergewichtes wie sie auch in diesem Falle vorliegt, entspricht den bekannten Wirkungen der Nebennierenrindensteroide. (HUBLE, 1957; SIEGEL, 1968). Bei den Hennen im großen Käfig vollzieht sich ein physiologischer Gewichtsanstieg.

Der hochsignifikante Abfall des Knochenaschegewichtes, d.h. die Verminderung der anorganischen Knochenbestandteile, bestätigt das Vorliegen einer Osteoporose bei den Tieren im engen Käfig.

Das Fehlen von 17-Hydroxycorticosteroiden im Harn der Hennen ist als nicht beweiskräftig anzusehen, da bei den hier durchgeführten Testen mit einer Testpackung der Firma Haury Fehlerquellen auftreten können.

Die Beweisführung über das Nichtvorkommen von 17-Hydroxycorticosteroiden im Hühnerharn ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Bei einzelnen Tieren im engen Käfig wird dreimal eine leichte und viermal eine stark vermehrte Harnausscheidung festgestellt. Diese Beobachtungen stimmen mit Mitteilungen von DEITRICK, WHEDON und SHORR (1948), AHO und HERRALA (1959), MOLINATTI, CAMANNI und OLIVETTI (1960), HERRERA et al. (1964) und McCALLY (1967) überin. Diese Autoren beschreiben ebenfalls eine hin und wieder leicht bis mittelgradig vermehrte Diurese, sowohl bei Personen, die durch Gipsverbände immobilisiert sind als auch bei solchen mit Cushing Syndrom. Bei diesen Fällen kommt es aber ebensowenig wie bei vorliegenden Versuchen zu einer dauernden Polyurie.

Die Auswertung der Versuche zeigt, daß gleichzeitig mit einer Immobilisation ein erhöhter Magnesiumblutspiegel auftritt, dem in einwöchigem Abstand eine Aktivierung der Nebennierenrinde mit erhöhter Hormonausscheidung und wiederum mit einer Woche Abstand eine erhöhte Calciumausscheidung mit dem Harn folgt. Diese ist mit einer verminderten Knochenmineralisierung verbunden. Schließt man aus den vorliegenden Ergebnissen auf das Syndrom der Käfigmüdigkeit der Hühner, dürfte wohl die

dort beobachtete Knochendemineralisierung mit der Immobilisation der Käfigtiere in Zusammenhang stehen. Die hierbei ablaufende Aktivierung der Nebennierenrindenhormone löst im Zusammenhang mit Störungen des Magnesiumstoffwechsels eine anhaltende Mineralisationsstörung aus. Ist die mangelnde Mineralisation genügend weit fortgeschritten, kommt es zum "Festliegen" der Hennen und zu den in der Literatur beschriebenen Frakturen.

Da aber Käfigtiere niemals so stark immobilisiert werden wie in den vorliegenden Versuchen, muß für das Auftreten des Syndroms der Käfigmüdigkeit auch noch eine besondere Reaktionslage des Organismus und besondere Milieuverhältnisse (z.B. soziale Hackordnung) angenommen werden.

Die von RIDELL (1967) und von RIDELL et al. (1968) beobachteten Frakturen der Wirbelsäule, die Bewegungsunfähigkeit bedingen, stehen zu den oben beschriebenen Folgerungen keineswegs im Gegensatz, da Frakturen Bedingungen unterworfen sein können, die osteoporotischen Ursprungs sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird bei 30 Hennen ein Anus praeternaturalis angelegt, um Harn von Kot getrennt zu gewinnen. Operationsmethode und Harnsammeltechnik werden beschrieben.

Von 15 in engen Käfigen weitgehend immobilisierten Hennen und 15 Kontrolltieren werden im Harn vergleichend die 17-Ketosteroide in toto und die 11-oxygenierten- 17-Ketosteroide einzeln, sowie Calcium bestimmt, ferner die Calcium-, Phosphor-, Magnesium- und Eiweißwerte im Blut.

Bei den immobilisierten Tieren geht ein signifikanter Anstieg des Blutmagnesiums auf 40,7 ± 9,56 ppm einer schnellen Zunahme der 17-Ketosteroidausscheidung im Harn voraus. Letzterer folgt eine drastische Erhöhung der Calciumausscheidung mit dem Harn (437 ± 38,80 ppm), die auch nach Normalisierung der 17-Ketosteroidwerte bestehen bleibt. Der Blutcalcium- und Blutphosphorspiegel bleibt während der Versuchsdauer bei den immobilisierten Tieren konstant, während in der Kontrollgruppe die Blutcalciumwerte auf die für Legehennen typische Höhe ansteigen. Auch vor der Erhöhung der Blutcalciumwerte der Kontrolltiere ist ein Anstieg des Blutmagnesiumspiegels zu beobachten.

Die Bedeutung der gleichzeitig an Tibien festgestellten Mineralisationsstörung für die Pathogenese der Käfigmädigkeit der Hühner wird diskutiert.

Summary

In 30 chickens a prenatural anus is operated, in order to collect urine. The technique for the surgery and the urine collection is described.

In the urine the total content of the 17-ketosteroids as well as the 11-oxygenic-17-ketosteroids (each separated) are analysed from 15 in small cages immobilized chickens and 15 of the control group. In addition, the level of calcium, phosphorus, magnesium, and proteins are determined.

It is shown, that in the immobilized birds a significant increase of the blood magnesium level (up to 40,7 ppm ± 9,56 ppm) proceeds a rapid increase of the 17-ketosteroids. The latter is followed by a remarkable increase of the calcium with the urine (437 ± 38,80 ppm), which continues even after the 17-ketosteroids having decreased to standards.

In the immobilized chickens the levels of blood calcium as well as of blood phosphorus are constant during the trial, whereas in the control group the blood calcium level reaches data, which are typical for layers in production. Also in the control group the increase of the magnesium blood level proceeds that of blood calcium.

The results of the coincidently observed disorder of the mineral metabolism of the tibias are discussed with regard to the pathogenesis of the cage layer fatigue.

LITERATURVERZEICHNIS

AHO, A.J. und A.J. HERRALA: Effects of prolonged Cortisone and Oestradiol Treatment on the Content of N, Ca, and P in the Bone of the Rat
Act. endocrin. 31 : 55 1959

BACHRA, B.N.O., R. TRAUTZ und S.L. SIMON: Precipitation of calcium carbonates and phosphates - III. The effect of magnesium and fluoride ions on the spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates.
Arch. Oral. Biol. 10 : 731 1965

BARTTER, F.C.: Osteoporosis
Am. J. Med. 22 : 797 1957

BRANDES, M.: Experimentelle Untersuchungen über den Eintritt der durch Inaktivität bedingten Knochenatrophie.
Münchner Med. Wschr. 60 : 1970 1913

BELL, D.J., W.G. SILLER und J.G. CAMPBELL: Observations of cage layer fatigue
Biochem. J. 72 : 32 1959

CARLSTRÖM, D.: Acta radiologica suppl. 121 1955

CLARK, J. und R.F. GOEFFREY: Studies in calcium metabolism
J. Biol. Chem. 233 : 203 1958

CLARK, J., R. GEOFFREY und W. BOWERS: Effects of adrenal steroids on the calcium metabolism
Endocrinology 64 : 849 1959

COUCH, J.R.: Cage Layer Fatigue
Feed Age p.55 and p.81 1955

COULSON, E.G. and J.S. HUGHES: Collection of chickens urine
Poultry Science 10 : 53 1930

DEITRICH, J.E., G.D. WHEDON und E. SHORR: the effects of immobilisation upon various metabolic and physiologic function of normal men.
Am. J. Med. 4 : 3 1948

DETTER, F., W. KOLLMEIER und V. KLINGMÜLLER: Das Muster der neutralen 17-Ketosteroide des Harns aufgrund der Dünnschichtchromatographie
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 5 : 153 196

DIXON, J.M. and W.S. WILKINSON: Surgical techniques for the exteriorisation of the ureters of the chicken.
Am. J. Vet. Res. 18 : 665 1947

DRAPER, H.H.: Physiological aspects of Aging
V. Ca and Mg metabolism in senescent mice
J. Nutrition 83 : 65 1964

EGER, W.: Pathologische Anatomie der Osteoporose unter besonderer Berücksichtigung der Mineralstoffwechselvorgänge im Knochengewebe
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 71. Kongress 1965

EISENSTADT, W.S. und E.B. COHEN: Osteoporosis and compression fractures from prolonged Cortison- and Corticotropin-Therapy.
Ann. of Allergy 13 : 252 1955

EWING, W.R.: Poultry Nutrition
R. Ewing Company, Pasadena, Calif.
5. Auflage 1963

GRUMBLES, L.C.: Cage Layer Fatigue
Southwestern Vet. 9 : 256 1955

GRAEF, V. und H. STAUDINGER: Trennung und Bestimmung von 17-Ketosteroiden aus dem Harn durch Dünnschichtchromatographie
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 5 : 314 1967

HART, W.M. und H.E. ESSEX: Water metabolism in the chicken
Am. J. Phys. 136 : 657 1942

HAURY, H.: Die photometrische Bestimmung von Magnesium im Serum
Arzneimittelforsch. 15 : 579 1965

HERRERA, M.G., G.F. CAHILL jr. und G.W. THORN: Cushing's Syndrome
Am. J. of Surg. 107 : 144 1964

HESTER, H.R., H.E. ESSEX und F.C. MANN: secretion of urine in the chicken
Am. J. Phys. 128 : 592 1940

HUBLE, J.: Effects of cortisone-acetate on chondrogenesis and ossification in cockerels
Act. endocrin. 25 : 59 1957

IVY, C.A., D.B. Bragg und E.L. STEPHENSON: Surgically exteriorizing the rectum of the growing chick Poultry
Science 47 : 1771 1968

JONES, J.C.: The Adrenal Cortex
Cambridge University Press 1957

KING, D.F.: Effects on cage size on the cage layer fatigue
Poultry Science 44 : 898 1965

KENNY, A.D.: Hypercalciuric response to acute Parathyreo-dektomy in rats. Effects of Adrenalectomie
Endocrinology 78 : 880 1965

KOLTHOFF, I.M.: Een nieuwe, specifieke kleurreactie op magnesium en een eenvoudige colorimetrische methode ter bepaling van sporen magnesium
Chem. Weekb. 24 : 254 1927

KURZWEG, G. und W. MASSMANN: Eine einfache Phosphorbestimmung
Roentgen-Lab. Praxis 15 : 237 1962

LAAKE, H.: The action of Corticosteroids on the renal reabsorption of calcium
Act. endocrin. 34 : 60 1960

MA, R.C.S. und A.V. NALBANDOV: Hypophyseal Autotransplants and the function of Testes, Thyreoid and Adrenal in birds
Advances in Neuroendocrin. 9 : 306 1963

McCALLY, M.: The effects of weightlessness
Science J. 39 1967

MOLINATTI, G.M., F. CAMANNI und M. OLIVETTI: A study on the metabolism of calcium in the Hyperadrenocortical Syndrome
Act. endocrin. 34 : 323 1960

NEWCOMER, W.S.: Effects of Hypophysectomie on some functional aspects of the Adrenal gland of the chicken
Endocrinology 65 : 133 1959

PILASKI, J.: Untersuchungen über den Einfluß einer künstlichen Immobilisation auf den Mineralstoffgehalt des Blutes und den Knochenaufbau der Legehenne
Arch. f. Geflügelk. 3 : 93 1970

PHILIPS, J.G. und J.C. JONES: The identity of Adrenocortical Secretions in lower vertebrates
J. endocrin. 16 : 111 1958

POTEL, K.: Lehrbuch der pathologischen Physiologie der Haustiere
Gustav Fischer Verlag 1969

RESKO, J.A., H.W. NORTON und A.V. NALBANDOV: Endocrine control of the Adrenal in chickens
Endocrinology 75 : 192 1964

RIDELL, C.: The pathology of caged birds fed two different phosphorus supplements
Master of Science Thesis
University of Connecticut USA 1967

RIDELL, C., C.F. HELMBOLDT, E.P. SINGSEN und L.D. METTERSON: Bone pathology of birds, affected with cage layer fatigue
Avian Dis. 12 : 285 1968

RIEDER, W.: Die akute Knochenatrophie
Z. für Chir. 248 : 269 1936

ROTHCHILD, J.: The artificial Anus in the bird
Poultry Science 26 : 157 1947

SCHEUNERT, A. und A. TRAUTMANN: Lehrbuch der Veterinär Physiologie
Paul Parey Verlag 5. Auflage 1965

SCHIEFER, B. und P. DORN: Wirbelsäulenbefunde bei Hennen mit Käfiglähme
BMTW 8 : 1 1969

SCHMIDT, A.: Physiologische, pharmakologische und toxikologische Aspekte des Knochenstoffwechsels
BMTW 14 : 281 1968

SCHNEIDER, R.: Flammenphotometrische Calciumbestimmung in Pflanzenaschen
Landw. Forsch. 6 : 200 1954

SCHNEIDER, R. und K. BARTH: Die Bestimmung der laktatlöslichen Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat
Mitt. Verb. Landw. Unters. Forsch. Anst. 5 : 8 1960

SIEGEL, E.T.: Effects of hormones on bone
The Cornell Vet. 58 : 95 1968

SNOYENBOS, G.M., M. SEVOIAN, D.L. ANDERSON und H.J. BASCH: Observatins on the bone structure of caged laying hens
Avian Dis. 1 : 349 1967

TAYLOR, T.G., J.H. MOORE und F. HERTELENDY: Variations in the mineral composition of individual bones of the skeleton of the domestic fowl
Brit. J. Nutr. 14 : 49 1960

URIST, M.R.: Cage Layer Osteoporosis
Endocrinology 67 : 879 1960 a

URIST, M.R. und N.M. DEUTSCH: Effects of cortisone upon blood, adrenal cortex, gonads, and the developement of osteoporosis in birds.
Endocrinology 66 : 805 1960 b

WAERDEN, B.L. van der: Mathematische Statistik
Springer Verlag 2. Auflage 1965

WEICHSELBAUM, F.E.: An accurate and rapid method for the determination of protein in small amounts of blood, serum, and plasma
Am. J. Clin. Path. 10 : 30 1946

WHITTOW, G.C., P.D. STURKIE und G. STEIN jun.:
Cardiovascular effects of hypothermia in the chicken
Nature 206 : 200 1965

ZAFFARONI, A.R., B. BURTON und E.H. KEUTMANN:
Science (Lancaster Paper) 111 : 6 1950

Frau Professor Dr. I. Gylstorff bin ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Auch allen Institutsangehörigen möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft recht herzlich danken.

L E B E N S L A U F

Am 29. September 1944 wurde ich in Frauenthal, Landkreis Euskirchen als Sohn des Diplom-Volkswirtes Dr. Theodor Heller und seiner Ehefrau Margit, geb. Stockhammer geboren.

Von Ostern 1951 bis Ostern 1955 besuchte ich die Grundschule zu Brühl/ Köln, anschließend bis Ostern 1961 das Städtische Gymnasium zu Brühl. Von 1961 ab war ich Schüler des Hermann-Josef-Kollegs zu Steinfeld/Eifel, an dem ich am 10. März 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1965 immatrikulierte ich mich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Die Veterinärpraktikantenzeit absolvierte ich bei den Herren Dr. F. Schneider in Brühl und Dr. J. Sens in Werthhoven bei Bonn. Die tierärztliche Prüfung bestand ich am 3. Februar 1970, am 6. April 1970 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Seit dem 1. März 1970 bin ich als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels angestellt.

Mit den Arbeiten zu vorliegender Dissertation war ich am Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels unter der Leitung von Frau Professor Dr. Gylstorff vom Oktober 1967 bis zum April 1971 beschäftigt.